

**DARSTELLUNG UND EIGENSCHAFTEN  
DES MENSCHLICHEN HARNKALLIKREINS**

Thomas Bettels

1976



Digitized by the Internet Archive  
in 2026



Aus dem Institut für Klinische Chemie und Klinische  
Biochemie der Universität München  
Komm. Leiter: Prof. Dr. rer. nat. Hans Fritz

DARSTELLUNG UND EIGENSCHAFTEN DES MENSCHLICHEN  
HARNKALLIKREINS

Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin  
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Thomas Bettels  
aus  
Immenstadt

1976

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin  
der Universität München

Berichterstatter:

Prof. Dr. H. Fritz

Dekan:

Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung:

27. Juli 1976



## Meinere Arbeit

### I. Zusammenfassung

### II. Einleitung

### III. Hauptteil

#### 1. Allgemeines

#### 2. Ziele

#### 3. Ergebnisse

Meinen Eltern

in Dankbarkeit gewidmet.

### IV. Schluss

#### 1. Zusammenfassung der Ergebnisse

#### 2. Zusammenfassung

#### 3. Zusammenfassung

#### 4. Zusammenfassung

#### 5. Zusammenfassung

#### 6. Zusammenfassung

#### 7. Zusammenfassung

#### 8. Zusammenfassung

#### 9. Zusammenfassung

#### 10. Zusammenfassung

#### 11. Zusammenfassung



## Inhaltsverzeichnis

|      |                                          |    |
|------|------------------------------------------|----|
| I.   | <u>Zusammenfassung</u>                   | 1  |
| II.  | <u>Einleitung</u>                        | 3  |
| III. | <u>Material</u>                          | 6  |
|      | 1. Menschlicher Harn                     | 6  |
|      | 2. Geräte                                | 6  |
|      | 3. Reagenzien                            | 7  |
| IV.  | <u>Methoden</u>                          | 9  |
|      | 1. Bestimmung der Kallikreinaktivität    | 9  |
|      | 1.1. Substrat: BzArgOEt                  | 9  |
|      | 1.2. Substrat: TosArgOMe                 | 11 |
|      | 1.3. Substrat: CbzTyrONp                 | 14 |
|      | 1.4. Substrat: Human HMW-Kininogen       | 15 |
|      | 2. Darstellung der Trasylo-Sepharose     | 16 |
|      | 3. Proteinbestimmung                     | 17 |
|      | 4. Acrylamidgel-Elektrophorese           | 18 |
|      | 4.1. Analytische Disc-Elektrophorese     | 18 |
|      | 4.2. Acrylamidgel-Elektrophorese mit SDS | 18 |
|      | 5. Isoelektrische Fokussierung           | 20 |

|        |                                                                     |    |
|--------|---------------------------------------------------------------------|----|
| V.     | <u>Ergebnisse</u>                                                   | 22 |
| 1.     | Isolierung des HUK                                                  | 22 |
| 2.     | Charakterisierung des HUK                                           | 26 |
| 2.1    | V-S-Diagramm                                                        | 26 |
| 2.1.1. | Substrat: BzArgOEt                                                  | 26 |
| 2.1.2. | Substrat: TosArgOMe                                                 | 27 |
| 2.1.3. | Substrat: CbzTyrONp                                                 | 28 |
| 2.1.4. | Substrat: Human HMW-Kininogen                                       | 28 |
| 2.2.   | Lineweaver-Burk-Diagramm                                            | 29 |
| 2.2.1. | Substrat: BzArgOEt                                                  | 29 |
| 2.2.2. | Substrat: TosArgOMe                                                 | 30 |
| 2.2.3. | Substrat: CbzTyrONp                                                 | 31 |
| 2.2.4. | Substrat: Human HMW-Kininogen                                       | 32 |
| 2.3.   | pH - Optimum                                                        | 33 |
| 2.4.   | Hitzestabilität                                                     | 34 |
| 2.5.   | Isoelektrischer Punkt                                               | 35 |
| 2.6.   | Molekulargewichtsbestimmung                                         | 36 |
| 2.6.1. | MG durch Gelfiltration                                              | 36 |
| 2.6.2. | MG durch Elektrophorese mit SDS                                     | 37 |
| 3.     | Untersuchungen zur Hemmung der<br>esterolytischen Aktivität des HUK | 38 |
| 3.1.   | Hemmung mit Trasylol                                                | 39 |
| 3.1.1. | Bestimmung des Hemmtyps                                             | 40 |
| 3.1.2. | Bestimmung der Inhibitorkonstanten                                  | 41 |
| 3.2.   | Hemmung mit Benzamidin-HCl                                          | 42 |
| 3.2.1. | Bestimmung des Hemmtyps                                             | 43 |
| 3.2.2. | Bestimmung der Inhibitorkonstanten                                  | 44 |
| VI.    | <u>Diskussion</u>                                                   | 45 |
| VII    | <u>Literaturübersicht</u>                                           | 49 |

### Abkürzungen:

|               |                                                 |
|---------------|-------------------------------------------------|
| HUK           | Menschliches Harnkallikrein (E. C. 3. 4. 21. 8) |
| BzArgOEt      | N <sup>d</sup> -Benzoyl-L-argininäthylester     |
| TosArgOMe     | Tosyl-L-argininmethylester                      |
| CbzTyrONp     | Carbobenzoxy-L-tyrosin-p-nitrophenylester       |
| ADH           | Alkoholdehydrogenase (E. C. 1. 1. 1. 1)         |
| TCA           | Trichloressigsäure                              |
| NAD           | Nicotinadenindinukleotid                        |
| LDH           | Laktatdehydrogenase                             |
| HMW-Kininogen | High molekular weight - Kininogen               |
| DTE           | Dithioerythrit                                  |
| TEMED         | N, N, N' , N' - Tetramethyläthylendiamin        |
| SDS           | Natriumdodecylsulfat                            |
| Tra           | Trasylol                                        |
| SBTI          | Sojabohnentrypsininhibitor                      |



## I. Zusammenfassung

Eine mehrstufige Methode zur Isolierung menschlichen Harnkallikreins durch Affinitätschromatographie mit trägergebundenem Trasylol und Gelfiltration wird beschrieben. Das Enzym wurde um den Faktor 212 angereichert.

Die Untersuchung des Enzyms ergab für die esterolytische Aktivität folgende Michaelis-Menten-Konstanten ( $K_m$ ) und maximale Geschwindigkeiten ( $V_{max}$ ):

| Substrat: | $K_m$ (M)             | $V_{max}$ ( $\mu\text{Mol Substrat} \times \text{min}^{-1}$<br>$\times \text{mg Protein}^{-1}$ ) |
|-----------|-----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|
| BzArgOEt  | $1.1 \times 10^{-3}$  | 7.14                                                                                             |
| TosArgOMe | $6.7 \times 10^{-2}$  | 20 000                                                                                           |
| CbzTyrONp | $7.4 \times 10^{-6}$  | 14.29                                                                                            |
| Kininogen | $1.33 \times 10^{-5}$ | 2.5                                                                                              |

Das pH - Optimum mit CbzTyrONp und Kininogen als Substrat lag im Bereich von 8.5 - 9.0.

Bei der isoelektrischen Fokussierung ließen sich 3 Isoenzyme unterscheiden mit den isoelektrischen Punkten bei pH 3.8, 3.9 und 4.05.

Bei einer Temperaturerhöhung über 40°C trat allmählich ein bis auf Null abfallender Aktivitätsverlust ein.

Die Molekulargewichtsbestimmung durch Gelfiltration lieferte einen Wert von 64 000, die SDS - Elektrophorese die Werte 29 000 und 45 000, wobei die stärkste Proteinbande bei 45 000 lag.

Für die Hemmung mit Trasylol (CbzTyrONp als Substrat) ergab sich eine Inhibitorkonstante ( $K_i$ ) von  $3.1 \times 10^{-9}$  M - die Bestimmung von  $K_i$  nach der Methode von Green und Work lieferte unter Zugrundelegung eines Molekulargewichts für HUK von 45 000:  $0.63 \times 10^{-9}$  M und eines Molekulargewichts von 29 000:  $1.02 \times 10^{-9}$  M.

Für die Hemmung mit Benzamidin-HCl (CbzTyrONp als Substrat) ergab sich ein  $K_i$ - Wert von  $0.2 \times 10^{-3}$  M.

Beide Substanzen hemmen kompetitiv. Sojabohnentrypsininhibitor zeigt keine Hemmung des HUK.

## II. Einleitung

Die Wirkung von Säugetierharn auf das Herz-Kreislaufsystem war schon seit Anfang des Jahrhunderts bekannt. So beschrieb 1909 Abelous und Bardier (1, 2) eine vasodilatierende Eigenschaft von Harn.

Der Chirurg E. K. Frey (3) fand 1930 auf der Suche nach der Ursache der postoperativen Reflexanurie, daß intravenöse Injektion von Hunde- und Menschenharn bei betäubten Hunden vorübergehend den Blutdruck senkt. Um auszuschließen, daß dieser Effekt auf das damals schon bekannte Histamin zurückzuführen sei, zeigte Frey, daß die festgestellte Wirksamkeit des Harns durch Dialyse erhalten blieb, beim Kochen jedoch verloren ging; das entsprach nicht dem Verhalten des Histamins. Der für dieses Verhalten verantwortliche Stoff, der zuerst F-Substanz genannt wurde, schien mit einem damals entdeckten blutdrucksenkenden Stoff des Pankreas identisch zu sein. So wurde zunächst das Pankreas als Bildungsort der F-Substanz angenommen. Hieraus erklärt sich der heute übliche Name "Kallikrein" nach dem griechischen Wort für Pankreas.

Bei weiteren Untersuchungen fand Werle (3, 4), daß die Harnkallikreinausscheidung bei pankreatektomierten Hunden nicht absank. Sogar die zusätzliche Herausnahme der Speicheldrüsen, die ebenfalls Kallikrein produzieren, führte zu keiner weiteren Erniedrigung der Kallikrein-Ausscheidung. Diese Ergebnisse deuteten zum ersten Mal auf die Niere als Hauptbildungsort des Harnkallikreins hin. Der endgültige Beweis der Identität des in der Zwischenzeit entdeckten Nierenkallikreins mit dem Harnkallikrein wurde jedoch erst in den letzten Jahren erbracht (5, 6).

Die physiologische Bedeutung des Harnkallikreins für den menschlichen Organismus konnte bis heute noch nicht restlos aufgeklärt werden. Es zeigte sich, daß Kallikrein aus Kininogen, einem Bestandteil der  $\alpha_2$ -Globulin-Fraktion des Serums, die Peptide Kallidin und Bradykinin freisetzt (5, 7, 8). Diese bringen glatte Muskulatur z. B. von Darm und Uterus zur Kontraktion und dilatieren Blutgefäße.

Schon früh wurde bei dem Krankheitsbild der Hypertonie ein veränderter Harnkallikreinspiegel beobachtet. So fand Werle 1938 (9) eine um das 4-fache erniedrigte Kallikreinausscheidung bei Patienten mit essentieller Hypertonie. Noch niedriger lagen die Werte bei renalem Hochdruck. Vermindert war das Harnkallikrein auch bei Diabetikern, die nicht mit Insulin eingestellt waren und bei gesunden Schwangeren in den letzten Monaten der Gravidität. Werle konnte ferner zeigen, daß die Kallikreinwerte des Speichels und des Blutes bei demselben Patienten in keinem erkennbaren Zusammenhang standen. Neuere Arbeiten, deren Ergebnisse hauptsächlich auf Tierversuchen basieren, gingen in dieser Richtung weiter. So wurde erhöhter Harnkallikreinspiegel bei Ratten mit essentieller Hypertonie festgestellt, stark erhöhter bei exogen erzeugtem Doca-Salzhochdruck und erniedrigter bei renaler Hypertonie (10).

Einige Autoren (11) sahen in Nierenkallikrein einen Regulator der Natriurese und einen Antagonisten des Renin-Angiotensin-Systems.

Dagegen wird in einer Arbeit von Mills und Ward (5) gezeigt, wie unter Normalbedingungen (freie Salz- und Wasseraufnahme) die Natriumausscheidung mit der Kallikreinausscheidung nur korreliert, wenn die Natriumausscheidung mit dem Urinvolumen korreliert.

Außerdem kann sich die Natriumausscheidung bei gleichbleibender Kallikreinausscheidung ändern, wenn sich der Mineralocorticoidspiegel ändert (Ausnahme: ein sehr hoher Mineralocorticoidspiegel). Harnkallikrein wird hier primär mit der Wasserregulation verbunden - als Vasopressinantagonist - gedacht.

Im Zusammenhang mit Kallikrein ist auch das Prostaglandin  $E_2$  erwähnenswert. Dieser im Gegensatz zu Harnkallikrein in der Medulla erzeugte Stoff schwächt die Wirkung der Pressorhormone ab (12). Sein Fehlen hat deren erhöhte Wirksamkeit in der Niere zur Folge und hat möglicherweise einen Anteil bei der Entstehung des Renovasculären Hochdrucks. Die Beziehung zum Harnkallikrein besteht in einer angenommenen Abhängigkeit der  $PGE_2$ -Sekretion von Kininen und damit von Kallikrein (13, 14): Bradykinin vermag  $PGE_2$  freizusetzen. Die Gefäßwirkung von Bradykinin wird zum Teil von  $PGE_2$  vermittelt (13).

Am hiesigen Institut wurde schon bei der Isolierung anderer Kallikreine die Affinitätschromatographie mittels Trasylol, einem Kallikreininhibitor, erfolgreich angewendet (15). Ziel der vorliegenden Arbeit war es, affinitätschromatographisch mit trägergebundenem Trasylol menschliches Harnkallikrein zu isolieren.

### III. Material

#### 1. Menschlicher Harn

Der zur Isolierung des Harnkallikreins benötigte Urin wurde in der Toilette der Ambulanz der Chirurgischen Universitätsklinik gesammelt und bis zur Aufarbeitung (ca. 1 - 2 Tage) bei 4°C aufbewahrt.

#### 2. Geräte

Fraktionensammler: LKB Produkter AB, S-16125 Bromma 1,  
Schweden

Pumpe: LKB- 10200 Perpex, S-16125 Bromma 1, Schweden

Christ-Zentrifuge: Typ UJ2, M. Christ, Osterode, Harz

Photometer: Eppendorf 1101 M verbunden mit Enzymrechner  
6452, 2000 Hamburg 63

Lyophilisator: Christ Typ Delta;

WKF L05

Flachgel-Elektrophorese-Apparatur: DESGA Heidelberg

Netzanschlußgerät: Shandon Southern

Elektrofokussiersäule: LKB-Ampholine<sup>R</sup>-Column Typ 8101

### 3. Reagenzien

#### Chromatographie

G-100, G-25, Bromcyan-Sepharose 4B von Pharmacia Uppsala

#### Proteine

von Boehringer Mannheim:

Phosphorylase b (Kaninchenmuskel)

Pyruvat-Kinase (Rindererythrozyten)

Laktatdehydrogenase (Kaninchenmuskel)

Alkoholdehydrogenase (Hefe, krist.)

von Serva Heidelberg:

Ovalbumin (krist. reinst)

γ-Globulin (Rinderserum, lyo. rein)

Cytochrom C (Pferdeherz, reinst, salzfr.)

Hämoglobin (Rind, lyo. rein)

#### Elektrophorese

von Serva Heidelberg:

Acrylamid p. A.

N, N, N', N' -Tetramethyläthylendiamin reinst

N, N' -Methylenbisacrylamid reinst

Ammoniumpersulfat krist. reinst

Natriumdodecylsulfat krist. reinst

Dithioerythrit reinst

Coomassie Brilliant Blue G-250

von E. Merck Darmstadt:

Tris-Puffer p. A.

Saccharose p. A.

Harnstoff p. A.

### Sonstiges

von E. Merck Darmstadt:

Ammoniumacetat p. A.

Merckotest Gesamteiweiß (Biuret Methode)

N<sup>d</sup>-Benzoyl-L-argininäthylester

Sojabohmentrypsininhibitor

von Serva Heidelberg:

Tosyl-L-argininmethylester

Carbobenzoxy-L-tryosin-p-nitrophenylester

von Bayer Leverkusen:

Trasylol 100.000 KIE, Amp. á 5 ml

von Boehringer Mannheim:

ß-Nicotinamidadenindinukleotid, freie Säure,

Reinheitsgrad II

von LKB Bromma 1, Schweden:

Ampholine<sup>R</sup> pH 3,0 - 5,0

von Aldrich B2340 Beerse, Belgien:

Benzamidinhydrochloridhydrat

Human HMW-Kininogen (isoliert nach 16)

#### IV. Methoden

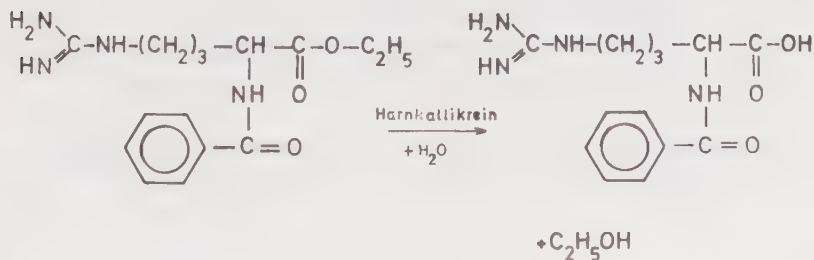
##### 1. Bestimmung der Kallikreinaktivität

Harnkallikrein (EC 3. 4. 21. 8) gehört zu der Gruppe der Peptidyl-Hydrolasen und besitzt im Gegensatz zu vielen Enzymen dieser Gruppe eine hohe Substratspezifität.

Neben der Spaltung des natürlichen Substrat Kininogen spaltet es eine Reihe von Estern, bevorzugt Argininester. Die estero-lytische Spaltungsaktivität bei Argininderivaten geht mit der kininbildenden Aktivität des Kallikreins parallel (17).

##### 1.1. Substrat: BzArgOEt (18)

Spaltungsreaktion:



Das bei der Reaktion freiwerdende Äthanol wird in einer Folge-  
reaktion mit ADH auf NAD übertragen und photometrisch be-  
stimmt.

Die Enzymeinheit mU (BzArgOEt/ADH - Test) ist wie folgt  
definiert: Hydrolyse von 1  $\mu$ Mol BzArgOEt / min.

Eine Extinktionsänderung von 0.0011  $\Delta E$ /min bei 25°C ent-  
spricht dann 1 mU.

#### Testansatz:

2.3 ml Pyrophosphat-Puffer:

15.7 g  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ , 4.1 g Semikarbazid und  
0.9 g Glycin in Aqua bidest. lösen; mit 2 N NaOH  
auf pH 8.7 einstellen, mit Aqua bidest. auf 500 ml  
auffüllen.

0.1 ml Nicotinadenindinukleotid:

60 mg NAD in 3 ml Aqua bidest. lösen.

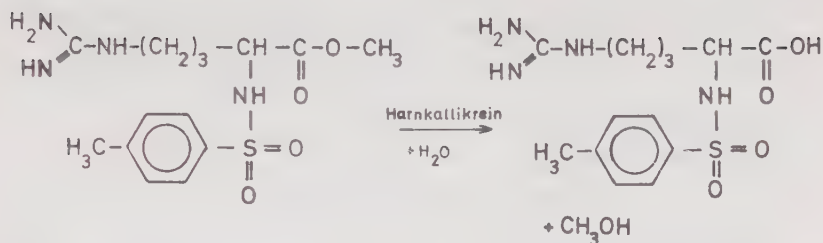
0.02 ml Alkoholdehydrogenase (30 mg Enzymprotein/nl)

0.5 ml BzArg OEt: 60 mg in 3 ml Aqua bidest. lösen.

Die Reaktion wird durch Zugabe von Kallikrein gestartet und  
5 min photometrisch bei 366 nm (25°C) verfolgt.

## 1.2. Substrat: TosArgOMe (19)

Spaltungsreaktion:



Das bei der Reaktion freigesetzte Methanol wird mit Kaliumpermanganat zu Formaldehyd oxydiert, das mit Chromotropsäure einen Farbstoff bildet, der bei 580 nm photometrisch bestimmt werden kann.

Die Enzymeinheit U ist wie folgt definiert:

Wird 1  $\mu\text{Mol}$  TosArgOMe in einer Minute bei 30°C umgesetzt, so besitzt das Enzym die Aktivität 1 U.

### Testansatz:

0.1 ml Enzym-Lsg.

0.1 ml TosArgOMe (0.1 M)

0.1 ml Tris-HCl-Puffer (pH 8.5, 0,75 M)

Der Ansatz wurde 30 min bei 30°C inkubiert und anschließend durch Zugabe von 0.2 ml 15 % (G/V) TCA-Lösung gestoppt. Das freigesetzte Methanol wurde wie folgt bestimmt:

0.1 ml 2 % Kaliumpermanganat-Lsg.

0.1 ml 10 % Natriumhydrogensulfit-Lsg.

4.0 ml 0.4 % Chromotropsäure in 67 % Schwefelsäure (v/v).

Der Ansatz wurde 15 min gekocht und danach die Extinktion bei 580 nm gemessen.

Zur quantitativen Auswertung wurde mit Methanol eine Eichkurve angefertigt. Dazu wurde der Testansatz wie folgt verändert:

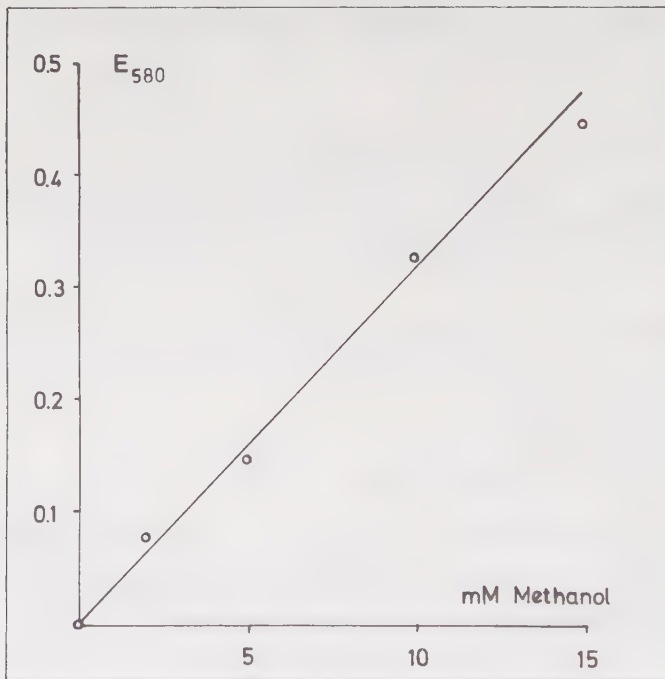
0.1 ml Methanol-Lsg. (0 - 15 mM)

0.1 ml dest. Wasser

0.1 ml Tris-HCl-Puffer (pH 8.5, 0,75 M)

Der Ansatz wurde wie oben beschrieben weiterbehandelt.

Eichkurve:



Die für eine bestimmte Extinktion aus der Eichkurve erhaltene Menge Methanol entspricht der in 30 min umgesetzten Menge an TosArgOMe (aus 1 Mol TosArgOMe wird 1 Mol Methanol freigesetzt).

Es ergibt sich folgende Beziehung:

$$\begin{aligned} 0,25 \Delta E &\hat{=} 8,25 \text{ mM Methanol} \hat{=} 8,25 \text{ mM TosArgOMe} / 30 \text{ min} = \\ &= 275 \mu\text{M TosArgOMe} / \text{min} \end{aligned}$$

Es gilt:

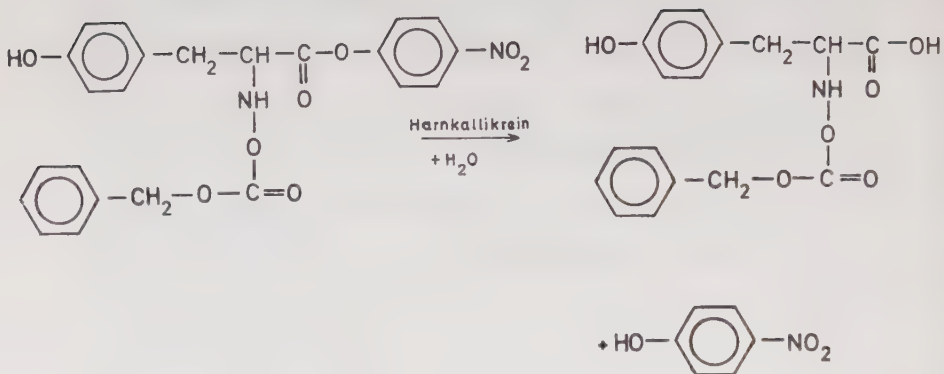
$$1 \text{ U (TosArgOMe - Test)} \hat{=} 1 \mu\text{M TosArgOMe} / \text{min}$$

d. f. :

$$1 \text{ U} \hat{=} \underline{\underline{0,00091 \Delta E / \text{min}}}$$

### 1.3. Substrat: CbzTyrONp (20)

Spaltungsreaktion:



Das bei der Reaktion freigesetzte Nitrophenol ist gelb gefärbt und kann spektrometrisch bei 405 nm bestimmt werden.

Eine Enzymeinheit U ist wie folgt definiert:

Umsatz von 1  $\mu\text{Mol}$  CbzTyrONp / min bei 25° C.

#### Testansatz:

1.5 ml 0.2 M Tris-HCl-Puffer pH 8.0

0.85 ml Wasser

0.45 ml CbzTyrONp-Lsg ( $2.5 \times 10^{-5}$  M  $\hat{=}$  3.3 mg in  
10 ml Wasser und 35 ml Methanol)

0.2 ml Enzymlösung

Die Reaktion wurde durch Zugabe von CbzTyrONp gestartet und die Änderung der Extinktion 5 min bei 405 nm verfolgt.

Die Temperatur betrug während der Messung 25° C.



## 2. Darstellung der Trasylol-Sephärose (23)

4 g gefriergetrocknete CNBr-aktivierte Sepharose 4B wurde mit 1 M HCl auf einem Sinterglasfilter gewaschen und gequollen. 30 mg Trasylol wurden in Natriumhydrogencarbonat-Puffer (0.1 M, 0.5 M NaCl, pH 8.3) aufgenommen.

Die Trasylol-Lösung und die Gelsuspension wurden 2 h bei Raumtemperatur geschüttelt.

Danach wurde die Suspension mit Äthanolamin-Lösung 2 h gespült und abschließend mit Ammoniumacetat-Puffer (0.1 M, 0.5 M NaCl, pH 4) gewaschen.

Die Trasylolsephärose wurde bei 4°C gelagert.

### 3. Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wurde nach der Biuret-Methode durchgeführt. Als Bezugsstandard diente Standardserum (60 mg/ml) der Firma Merck.

Ansatz:

|                             | Analyse      | Blindwert    | Standard     | Eigenabsorption |
|-----------------------------|--------------|--------------|--------------|-----------------|
| Probe                       | 20 $\mu$ l   | -            | -            | 20 $\mu$ l      |
| Aqua dest.                  | -            | 20 $\mu$ l   | -            | 1000 $\mu$ l    |
| Stand. Ser.                 | -            | -            | 20 $\mu$ l   | -               |
| Biuret Reag.<br>1 : 5 verd. | 1000 $\mu$ l | 1000 $\mu$ l | 1000 $\mu$ l | -               |

Nach 30 min wurde die Extinktion bei 546 nm in Küvetten von 1 cm Schichtdicke gegen Aqua dest. gemessen.

$$\text{Berechnung: } \frac{E (\text{Analyse} - \text{Eigena.}) - E \text{ Blindwert}}{E \text{ Standard} - E \text{ Blindwert}} \times 60$$

$$= \text{Eiweißkonzentration in mg/ml}$$

Zur Abschätzung der Proteinkonzentration wurde noch die Extinktionsmessung (24) von Proben bei 280 und 260 nm herangezogen.

#### 4. Acrylamidgel-Elektrophorese

##### 4.1. Analytische Disc-Elektrophorese

Die Reinheit der Harnkallikrein-Präparation wurde mit Disc-Elektrophoreseläufen überprüft.

Im Sammelgel erfolgte Konzentrierung der aufgetragenen, mit Saccharose versetzten Proben, zu einer scharfen Bande.

Im Trenngel wurden die Proteine nach Ladung und Größe getrennt.

Es wurde das Gel-System Nr. 1a (pH 8.9, 7 % Gel) nach Maurer (25) verwendet. Die Gele wurden nach König (25) mit Coomassie-Blue angefärbt und mit einer Lösung von Eisessig : Methanol : Wasser = 1 : 6 : 14 entfärbt.

##### 4.2. Acrylamidgel-Elektrophorese mit SDS

Zur Bestimmung des Molekulargewichts wurden Acrylamidgel-Elektrophoreseläufe mit SDS nach Dunkert und Rueckert (26) durchgeführt.

###### A. Elektrodenpuffer:

13.8 g Natriumdihydrogenphosphat in 1000 ml Aqua dest. lösen und mit konz. Natronlauge auf pH 7.2 einstellen. In die Pufferlösung für die obere Kammer der Elektrophoreseapparatur wird 0.1 % SDS gegeben.

B. Lösungen für das Gel (pH 7.2, 7.5 %):

- |   |                                                             |
|---|-------------------------------------------------------------|
| 1 | 22.5 g Acrylamid, 0.765 g BIS<br>in 100 ml Elektrodenpuffer |
| 2 | 0.15 g SDS, 0.15 g DTE in 100 ml Elektroden-<br>puffer      |
| 3 | TEMED                                                       |
| 4 | 1 % Ammoniumpersulfatlösung                                 |

Acrylamid und Bisacrylamid werden im Verhältnis 30 : 1 verwendet.

C. Mischungsverhältnis des Gels:

- |   |         |
|---|---------|
| 1 | 10 ml   |
| 2 | 20 ml   |
| 3 | 0.06 ml |
| 4 | 2 ml.   |

Diese Mischung wurde in die Gelkammer gefüllt und anschließend 1 h polymerisiert. Die mit Saccharose versetzten Proteinproben (50  $\mu$ l) wurden aufgetragen und bei 90 V und 140 mA getrennt.

Färben und Entfärben wie unter 4.1. beschrieben.

## 5. Isoelektrische Fokussierung

Die isoelektrischen Punkte der Isoenzyme des Harnkallikreins können durch isoelektrische Fokussierung bestimmt werden (27).

Prinzip: In einem elektrischen Feld wandern die Isoenzyme in einer Ampholytlösung von kontinuierlich verändertem pH-Wert so lange, bis sie ihren isoelektrischen Punkt erreicht haben. Jedes Protein beendet seine Wanderung bei dem seine Ladung (neutral) ausgleichenden pH-Wert. Hierdurch kommt es zu einer Auftrennung der Isoenzyme.

### Anodenpuffer:

1 ml 1 M Phosphorsäure und 12 g Saccharose in 21 ml Aqua bidest. lösen.

### Kathodenpuffer:

0.25 ml Ampholine<sup>R</sup> 20 % (pH 3-5) in 10 ml Aqua bidest. lösen.

### Ampholyt:

Schwere Lösung: 2.3 ml Ampholine<sup>R</sup> 20 % (pH 3-5) und 28 g Saccharose in 60 ml Aqua bidest. lösen.

Leichte Lösung: 0.7 ml Ampholine<sup>R</sup> 20 % (pH 3-5) in 60 ml Aqua bidest. lösen. Dazu wurden 0.9 mg Protein (HUK) gegeben.

Der Kathodenpuffer wurde in eine Isoelektrofokussiersäule gefüllt und eine Ampholytlösung, die einen Saccharose-Gradienten und das Protein enthielt, überschichtet. Darauf wurde der Anodenpuffer gegeben.

Eine Spannung von 500 V bei einer Stromstärke von 6 mA wurde 12 Stunden lang angelegt.

Es bildete sich ein pH-Gradient von 1.6 - 5.4 aus.

Nach der Fokussierung wurde das innere Rohr (Anode) der Isoelektrofokussiersäule verschlossen, und der Inhalt des äußeren Mantels durch eine Photozelle eines Photometers gepumpt und in Fraktionen aufgefangen. Es folgte die Messung der Extinktion bei 280 und 260 nm und die des pH-Wertes jeder Fraktion.

## V. Ergebnisse

### 1. Isolierung des HUK

#### Übersicht:

Darstellung von dialysiertem Urintrockenpulver

Extraktion des Urintrockenpulvers

1. G-100 Sephadex-Säule

Trasylol-Sepharose-Säule

G-25 Sephadex-Säule

2. G-100 Sephadex-Säule

#### Darstellung von dialysiertem Urintrockenpulver

Männlicher menschlicher Harn wurde in 10 l Eimern gesammelt, anschließend 24 h gegen Leitungswasser dialysiert und lyophilisiert.

#### Extraktion des Urintrockenpulvers

30 l lyophilisierter Harn wurden im Eisbad mit 70 ml Aqua dest. versetzt und 20 min gerührt.

Anschließend wurde zentrifugiert (8000 g) und ein dunkelbrauner Überstand von 29 ml erhalten (Eluat A).

#### 1. G-100 Sephadex-Säule

Das Eluat A wurde auf eine wassergekühlte G-100 Sephadex-Säule (60 x 4,3 cm) gegeben und mit Aqua dest. eluiert.

Die Durchflußgeschwindigkeit betrug 50 ml/h; es wurden Fraktionen zu 12 ml gesammelt.

Nach Bestimmung der BzArgOEt- und Kininogenspaltenden Aktivität wurden die aktiven Fraktionen vereinigt (Eluat B) und lyophilisiert.

### Trasylol-Sepharose-Säule

Das lyophilisierte Eluat B wurde in 4.3 ml Puffer (0.025 M Di-Natrium-Hydrogenphosphat, 0.025 M Kalium-Dihydrogenphosphat, 0.75 M NaCl mit NaOH auf pH 7.0 eingestellt) gelöst und über eine Trasylol-Sepharose-Säule (20 x 0.9 cm) gepumpt.

Die Durchflußgeschwindigkeit betrug 4 ml/h; es wurden Fraktionen zu 2.5 ml gesammelt. Die durchgelaufene Proteinlösung enthielt keine BzArgOEt- und Kininogenspaltende Aktivität und wurde verworfen.

Die an die Trasylol-Sepharose-Säule gebundenen Proteine wurden mit 1 M Benzamidinhydrochlorid-Lsg. (0.025 M Di-Natrium-Hydrogenphosphat, 0.025 M Kalium-Dihydrogen-Phosphat, 0.75 M NaCl; mit NaOH auf pH 7.0 eingestellt) abgelöst und eluiert.

Die Elution wurde nach 10 h (40 ml Durchfluß) beendet und die erhaltene Lösung 48 h gegen Aqua dest. bei 4°C dialysiert und anschließend lyophilisiert.

### G-25 Sephadex-Säule

Das Lyophilisat wurde in 1.2 ml 0.05 M Ammoniumacetatpuffer (pH 7.0) gelöst und auf eine G-25 Sephadex-Säule (65 x 1.4 cm) gegeben und mit 0.05 M Ammoniumacetatpuffer (pH 7.0) eluiert.

Die Durchflußgeschwindigkeit betrug 30 ml/h, es wurden Fraktionen zu 2.5 ml gesammelt. Die aktiven Fraktionen wurden vereinigt und lyophilisiert (Eluat C).

Das HUK konnte vollständig von Benzamidin abgetrennt werden.

### 2. G-100 Sephadex-Säule

Das Lyophilisat (Eluat C) wurde in 0.5 ml 0.05 M Ammoniumacetatpuffer (pH 7.0) gelöst und auf eine G-100 Sephadex-Säule (100 x 0.9 cm) aufgetragen. Eluiert wurde mit 0.05 M Ammoniumacetatpuffer (pH 7.0).

Die Durchflußgeschwindigkeit betrug 4 ml/h, es wurden Fraktionen zu 1.5 ml gesammelt.

Die Fraktionen 23 - 29 enthielten das elektrophoretisch reine Harnkallikrein (vgl. 4.1).

Anreicherungsübersicht des menschlichen Harnkalikreins

| Stufe                      | Volumen<br>ml | Gesamt-<br>protein<br>mg | Gesamt-<br>units<br>mU<br>BzArg-<br>OEt | Gesamt-<br>units<br>mU<br>CbzTyr-<br>ONp | Gesamt-<br>units<br>U<br>Kinino-<br>gen x | Spez. A.<br>mU/mg<br>Prot.<br>BzArg-<br>OEt (a) | Spez. A.<br>mU/mg<br>Prot.<br>CbzTyr-<br>ONp (b) | Spez. A.<br>U/mg<br>Prot.<br>Kinino-<br>gen x(c) | a<br>-<br>c | b<br>-<br>c | x    |
|----------------------------|---------------|--------------------------|-----------------------------------------|------------------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------------|--------------------------------------------------|--------------------------------------------------|-------------|-------------|------|
| Urin-<br>roh-<br>extr.     | 30            | 3 120                    | 29 400                                  | 25 200                                   | 19.9                                      | 0.0094                                          | 0.008                                            | 0.006                                            | 1.492       | 1.28        | -    |
| Eluat<br>1. G-100<br>Säule | 565           | 876                      | 158 200                                 | 943 550                                  | 423.8                                     | 0.181                                           | 1.077                                            | 0.483                                            | 0.377       | 2.23        | 1    |
| Eluat<br>G-25<br>Seph. S.  | 22.6          | 5.7                      | 27 120                                  | 506 240                                  | 244.1                                     | 4.76                                            | 88.8                                             | 42.8                                             | 0.111       | 2.075       | 88.6 |
| Eluat<br>2. G-100<br>Säule | 10.5          | 2.1                      | 12 347                                  | 448 269                                  | 215                                       | 5.88                                            | 213,5                                            | 102.4                                            | 0.057       | 2.08        | 212  |

x Human HMW-Kininogen

## 2. Charakterisierung des HUK

### 2.1. V-S-Diagramm

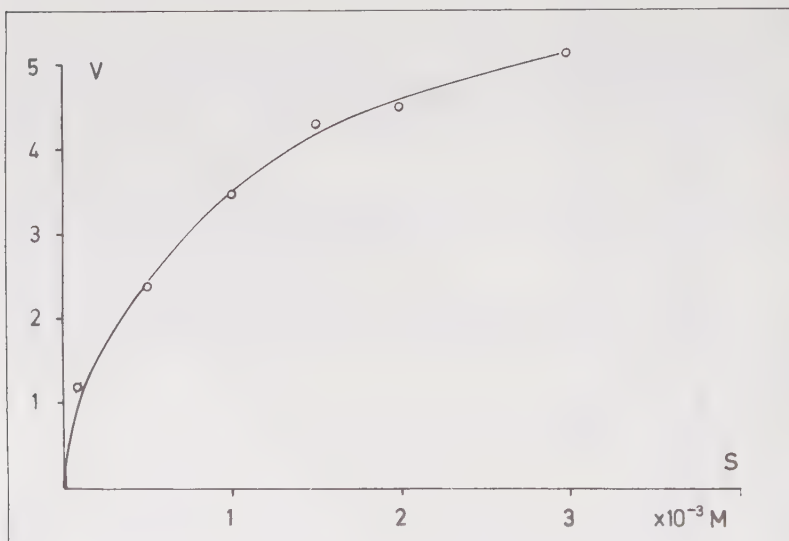
Die kinetischen Untersuchungen wurden alle mit gereinigtem Enzym durchgeführt.

Die Geschwindigkeit  $V$  ist definiert:

$$V = \frac{\text{umgesetzte Menge an Substrat in } \mu\text{Mol}}{\text{min} \times \text{mg Protein}}$$

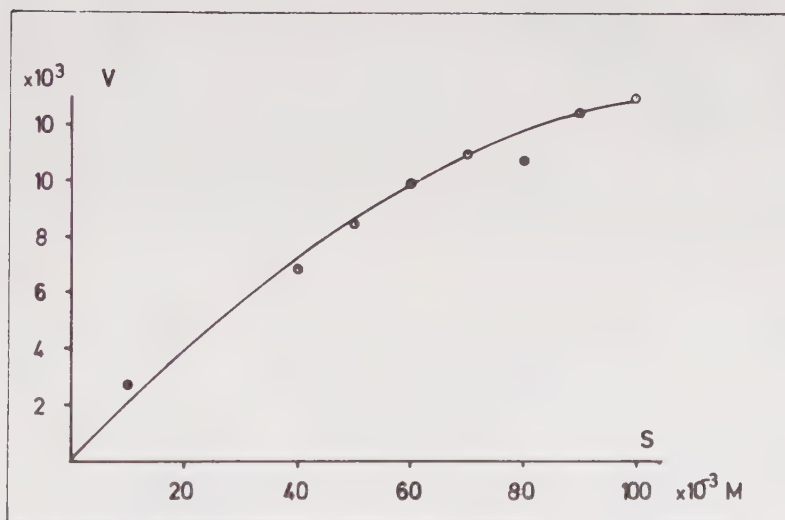
#### 2.1.1. Substrat: BzArgOEt

$$V = \Delta E_{366} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg Protein}^{-1}$$



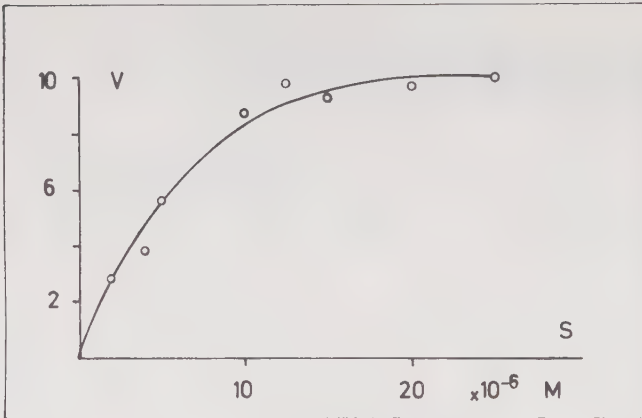
2.1.2. Substrat: TosArgOMe

$$V = \mu\text{Mol TosArgOMe} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg Protein}^{-1}$$



2.1.3. Substrat: CbzTyrONp

$$V = \mu\text{Mol CbzTyrONp} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg Protein}^{-1}$$

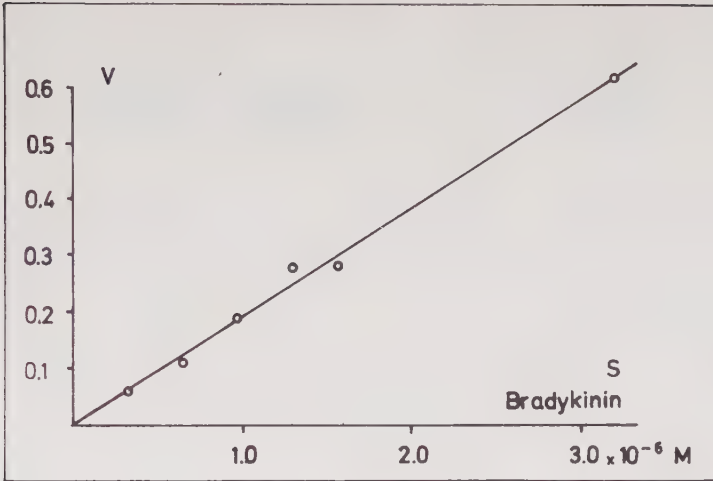


2.1.4. Substrat: Human HMW-Kininogen

Das Substrat (Human HMW-Kininogen) ist eine angereicherte Präparation und enthält noch Salze und Fremdprotein. Eine Mengenangabe für Kininogen ist nur indirekt über die aus der Präparation pro mg Protein mit Hilfe von Trypsin freisetzbaren Menge an Kininen möglich (28).

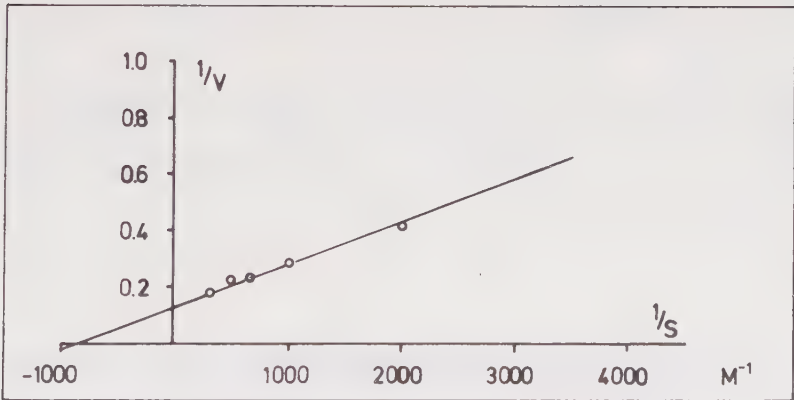
Die Abszissenwerte geben die Mengen an Bradykinin in M an, die aus unterschiedlichen Mengen Kininogen-Präparation freigesetzt werden können.

$$V = \mu\text{Mol Bradykinin} \times \text{min}^{-1} \times \text{Protein}^{-1}$$



## 2.2. Lineweaver-Burk-Diagramm

### 2.2.1 Substrat: BzArgOEt

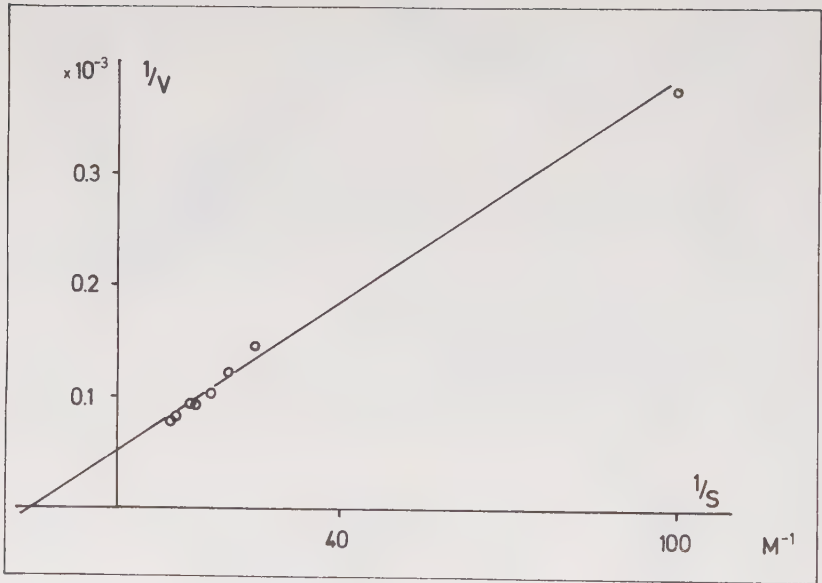


Das Lineweaver-Burk-Diagramm ergibt für  $K_m$  und  $V_{\max}$  folgende Werte:

$$K_m = 1.1 \times 10^{-3} \text{ M}$$

$$V_{\max} = 7.14 \mu\text{Mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg Protein}^{-1}$$

2.2.2. Substrat: TosArgOMe

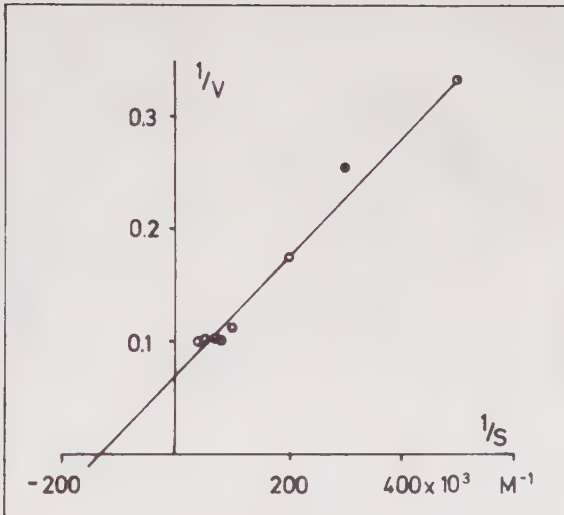


Das Lineweaver-Burk-Diagramm ergibt für  $K_m$  und  $V_{\max}$  folgende Werte:

$$K_m = 6.7 \times 10^{-2} \text{ M}$$

$$V_{\max} = 20 \text{ mMol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg Protein}^{-1}$$

2.2.3. Substrat: CbzTyrOMe

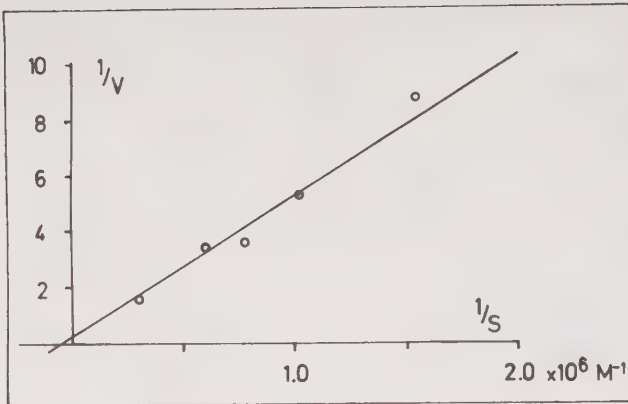


Das Lineweaver-Burk-Diagramm liefert für  $K_m$  und  $V_{\max}$  folgende Werte:

$$K_m = 7.4 \times 10^{-6} \text{ M}$$

$$V_{\max} = 14.29 \mu\text{Mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg Protein}^{-1}$$

2.2.4. Substrat: Human HMW-Kininogen



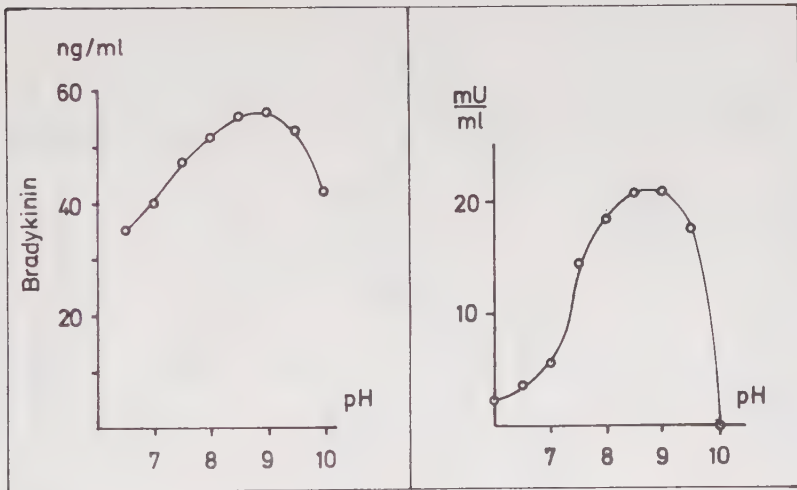
Das Lineweaver-Burk-Diagramm ergibt für  $K_m$  und  $V_{\max}$  folgende Werte:

$$K_m = 1.33 \times 10^{-5} \text{ M}$$

$$V_{\max} = 2.5 \mu\text{Mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg Protein}^{-1}$$

### 2.3. pH - Optimum

Zur Bestimmung des pH-Optimums wurde das Enzym wie unter IV.1.4. und IV. 1.3. beschrieben bei ansteigendem Puffer-pH inkubiert.



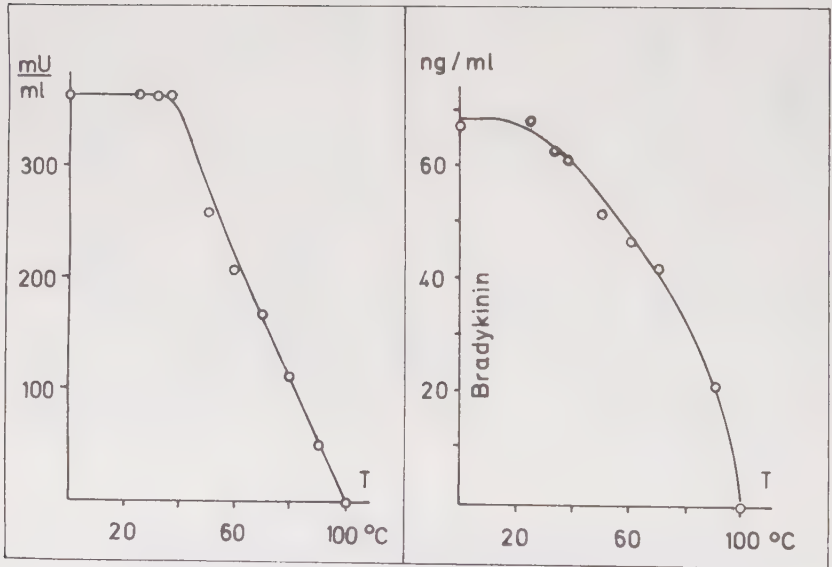
Substrat: Kininogen

Substrat: CbzTyrOMe

Das Harnkallikrein des Menschen hat ein pH-Optimum im Bereich von pH 8.5 - 9.0.

#### 2.4. Hitzestabilität

Zur Bestimmung der Hitzestabilität wurde HUK 15 min bei unterschiedlichen Temperaturen inkubiert und unter den für die Substrate angegebenen Bedingungen getestet (vgl. IV. 1. 3. und IV. 1. 4.)



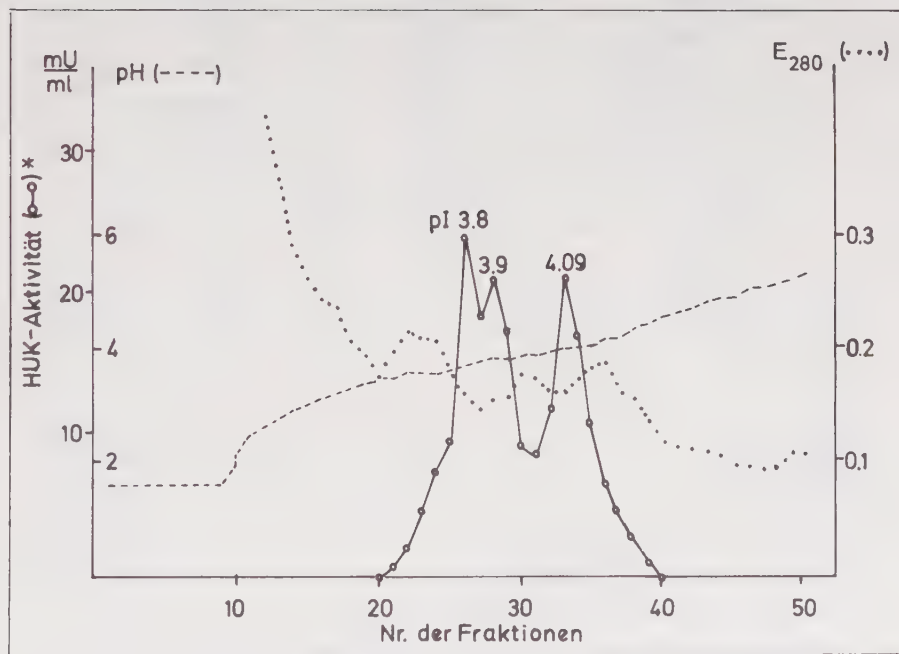
Substrat: CbzTyrONp

Substrat: Human

HMW-Kininogen

## 2.5. Isoelektrischer Punkt

Die isoelektrischen Punkte wurden durch isoelektrische Fokussierung bestimmt.



\*Substrat: CbzTyrONP

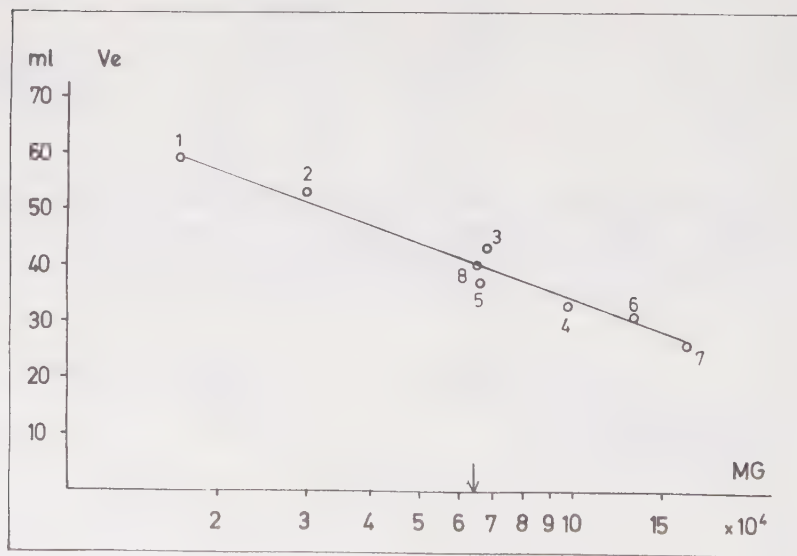
## 2.6. Molekulargewichtsbestimmung

### 2.6.1. MG durch Gelfiltration

Um das Molekulargewicht des Enzyms abzuschätzen, wurde eine Gelfiltration mit G-100 Sephadex durchgeführt. Es wurde ein Wert von ca. 64.000 gefunden.

#### Vergleichsproteine:

| Nr. | Protein            | MG      | Vol. (ml) |
|-----|--------------------|---------|-----------|
| 1   | Cytochrom c        | 13 400  | 59        |
| 2   | Carboanhydrase     | 30 000  | 53        |
| 3   | Hämoglobin         | 68 000  | 43        |
| 4   | Phosphorylase      | 98 000  | 33        |
| 5   | BSA                | 66 000  | 37        |
| 6   | BSA-di             | 132 000 | 31        |
| 7   | $\gamma$ -Globulin | 169 000 | 26        |
| 8   | HUK                | -       | 39        |

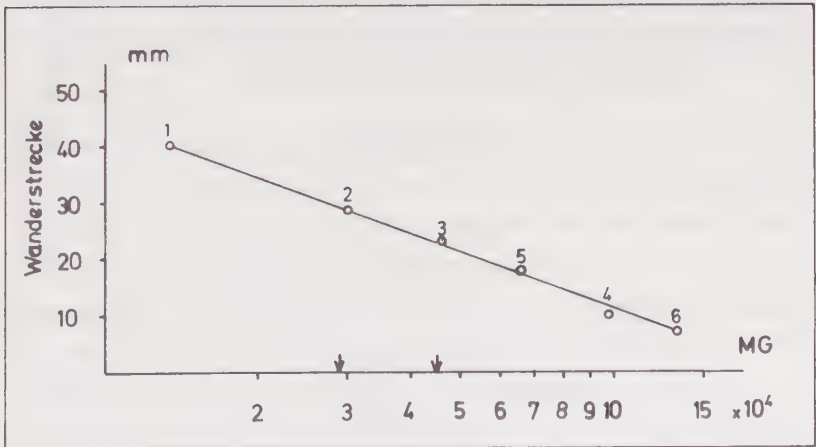


### 2.6.2. MG durch Elektrophorese mit SDS

Zur Bestimmung des Molekulargewichts mit Hilfe der SDS-Elektrophorese wurden die Proteine mit Harnstoff, SDS und Mercaptoäthanol 1 h bei 45°C inkubiert.

#### Vergleichssubstanzen:

| Nr. | Protein        | MG      | Wanderstrecke (mm) |
|-----|----------------|---------|--------------------|
| 1   | Cytochrom c    | 13 400  | 40                 |
| 2   | Carboanhydrase | 30 000  | 29                 |
| 3   | Ovalbumin      | 46 000  | 23                 |
| 4   | Phosphorylase  | 98 000  | 10                 |
| 5   | Rinderserum    | 66 000  | 18                 |
| 6   | Rinderserum-di | 132 000 | 7                  |
| 7   | HUK            | -       | 23, 29             |



Das elektrophoretisch reine HUK (7.5 % nach Maurer 1a, IV. 4. 1.) zeigte nach Reduktion in der SDS-Elektrophorese 2 Banden: sie bestimmten sich zu 45 000 und 29 000.

### 3. Untersuchungen zur Hemmung der esterolytischen Aktivität des HUK.

Zur weiteren Charakterisierung des Enzyms wurde die Art der Hemmung durch Inhibitoren wie Trasylol, Benzamidinhydrochlorid und SBTI bei unterschiedlichen Substraten untersucht. Dabei zeigte es sich, daß HUK durch Trasylol und Benzamidin gehemmt wird (Substrat: Human-HMW-Kininogen und CbzTyrONp), SBTI verursachte jedoch keine Hemmung.

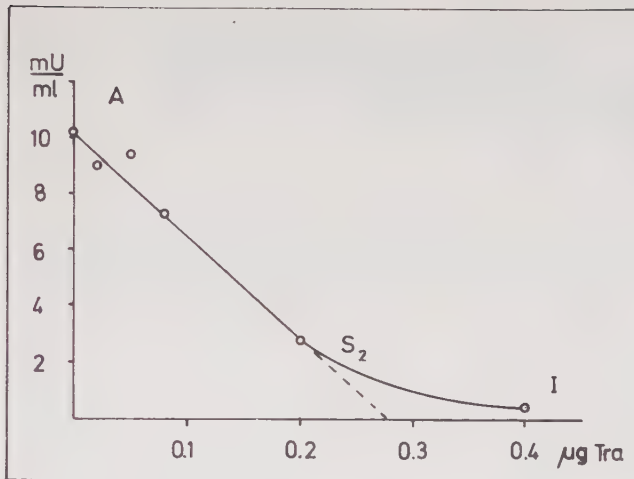
Es lassen sich u. a. drei Hemmtypen unterscheiden (29): Die kompetitive Hemmung ( $V_{\max}$  konstant,  $K_m$  ändert sich), die nichtkompetitive Hemmung ( $K_m$  konstant,  $V_{\max}$  ändert sich) und die unkompetitive Hemmung ( $K_m$  und  $V_{\max}$  ändern sich).

Um den Hemmtyp zu bestimmen, wurde bei verschiedenen Inhibitorkonzentrationen die Abhängigkeit der Umsatzgeschwindigkeit von der Substratkonzentration gemessen.

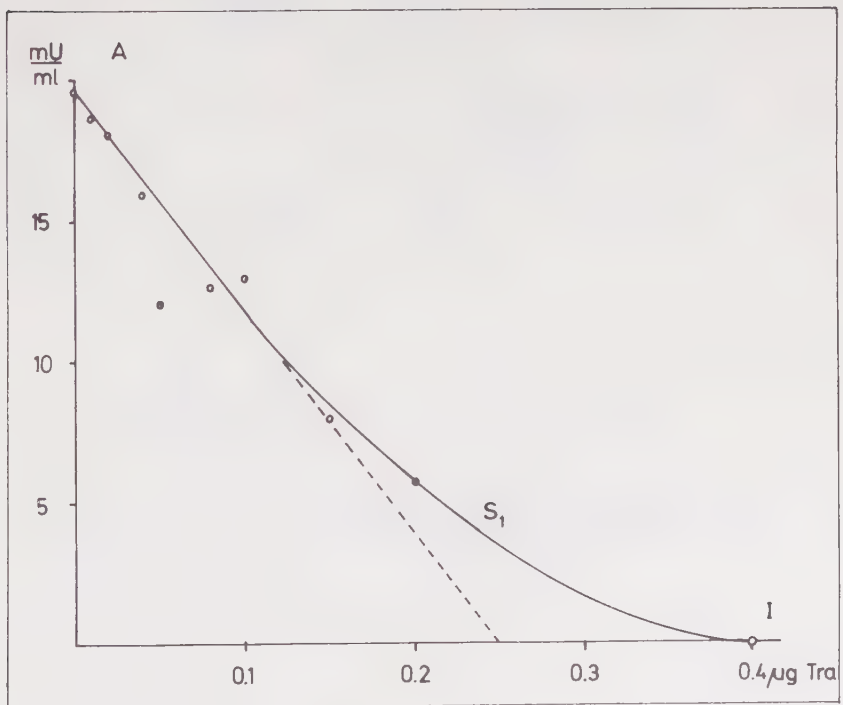
Zur Bestimmung der Inhibitorkonstanten können zwei Verfahren angewendet werden. Erstens die Abhängigkeit des Kehrwerts der Geschwindigkeit von der Inhibitorkonzentration bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen: der Schnittpunkt ergibt auf der X-Achse die Inhibitorkonstante - zweitens die Methode von Green und Work (30): Dazu wird der lineare Kurvenverlauf der Titration des HUK mit den Inhibitoren, der sich bei höheren Inhibitorkonzentrationen asymptotisch der Abszisse nähert, linear extrapoliert, und aus dem erhaltenen Schnittpunkt die Inhibitorkonstante berechnet.

### 3.1. Hemmung mit Trasylol

Substrat: CbzTyrONp



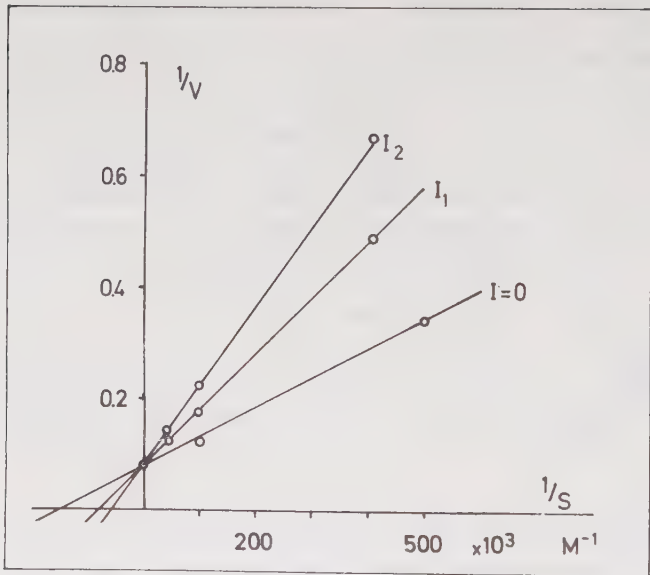
$$S_2 = 1 \times 10^{-5} \text{ M}$$



$$S_1 = 2.5 \times 10^{-5} \text{ M}$$

3.1.1. Bestimmung des Hemmtyps:

Substrat: CbzTyrONp



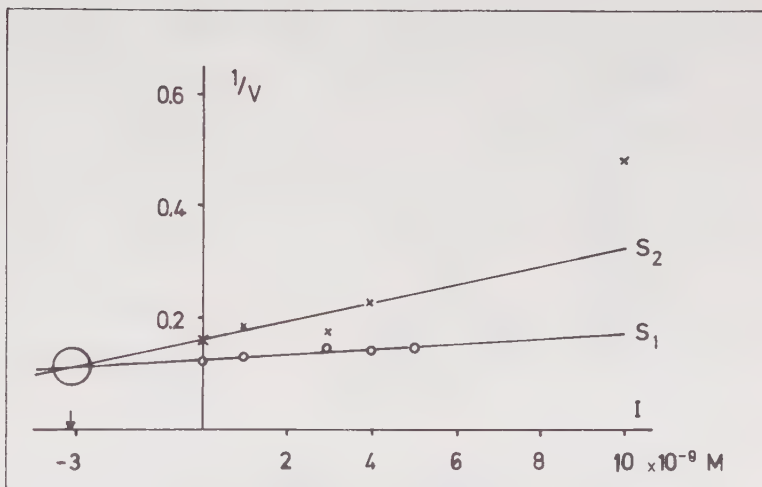
$$K_m = 1.3 \times 10^{-5} \text{ M} \quad (I_1 = 0.02 \text{ } \mu\text{g Tra})$$

$$K_m = 1.66 \times 10^{-5} \text{ M} \quad (I_2 = 0.08 \text{ } \mu\text{g Tra})$$

Trasylol hemmt HUK kompetitiv.

### 3.1.2. Bestimmung der Inhibitorkonstanten:

Substrat: CbzTyrONp



$$S_1 = 2.5 \times 10^{-5} \text{ M}$$

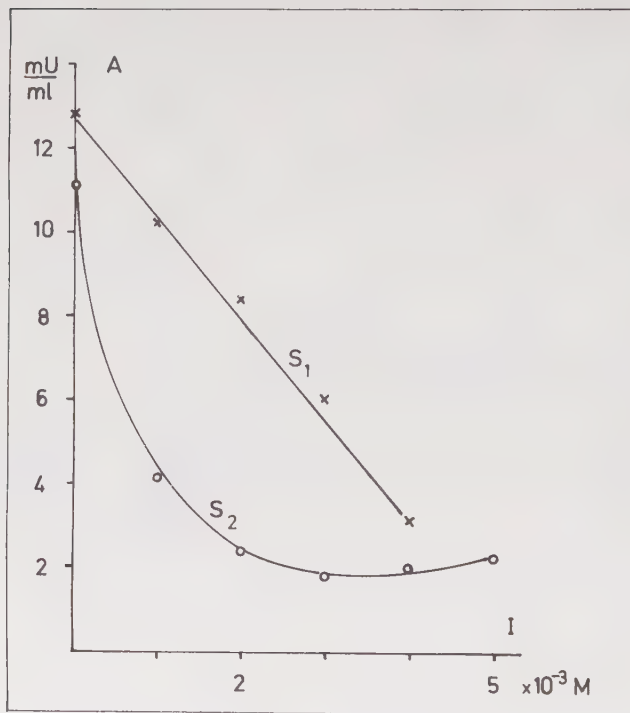
$$S_2 = 1 \times 10^{-5} \text{ M}$$

Man erhält eine Inhibitorkonstante von  $3.1 \times 10^{-9} \text{ M}$

Nach dem Verfahren von Green und Work (30) ergibt sich ein  $K_i$ -Wert von  $0.36 \times 10^{-9} \text{ M}$  (Molekulargewicht 45 000) und  $1.02 \times 10^{-9} \text{ M}$  (Molekulargewicht 29 000).

3.2. Hemmung mit Benzamidin-HCl 、

Substrat: CbzTyrONp

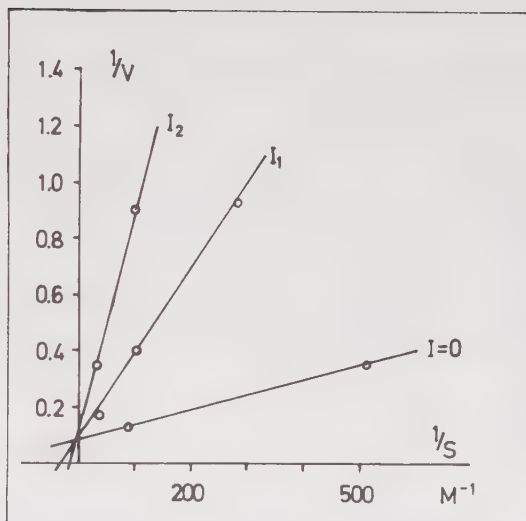


$$S_1 = 2.5 \times 10^{-5} M$$

$$S_2 = 1 \times 10^{-5} M$$

### 3.2.1. Bestimmung des Hemmtyps:

Substrat: CbzTyrONp



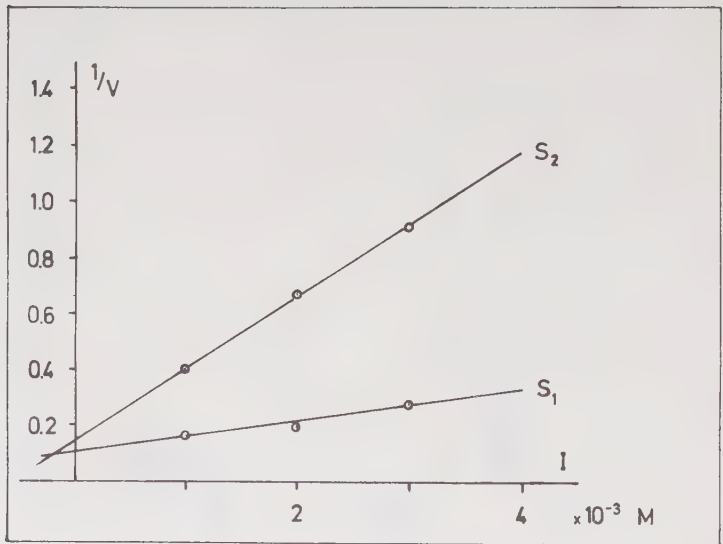
$$K_m = 0.04 \text{ M} \quad (I_1 = 1 \times 10^{-3} \text{ M})$$

$$K_m = 0.1 \text{ M} \quad (I_2 = 3 \times 10^{-3} \text{ M})$$

Benzamidinhydrochlorid hemmt HUK kompetitiv.

3.2.2. Bestimmung der Inhibitorkonstanten:

Substrat: CbzTyrONp



$$S_1 = 2.5 \times 10^{-5} \text{ M}$$

$$S_2 = 1 \times 10^{-5} \text{ M}$$

$$K_i = 0.2 \times 10^{-3} \text{ M}$$

## VI. Diskussion

### 1. Isolierung des HUK:

Die hier beschriebene Methode der Isolierung beinhaltet Erfahrungen, die in vorausgegangenen Arbeiten von Pierce (31), Porcelli (32, 33), Diniz (34), Hial (35) und Moriya (36) gemacht wurden.

In dieser Arbeit wurde erstmals Affinitätschromatographie mit Tra-sylolsepharose zur Darstellung menschlichen Harnkallikreins angewandt. Sie erbrachte in dem vierstufigen Isolierverfahren den anteilmäßig größten Reinigungsgewinn (Übersicht S. 25).

Die paradoxe Zunahme der Gesamtaktivität des Rohurin-Extraktes nach dem ersten Reinigungsschritt auf einer G - 100 Säule läßt sich möglicherweise mit im Rohurin noch vorhandenen Inhibitoren oder einer Aktivierung von Enzymvorstufen erklären. Eine Aktivitätszunahme nach dem ersten Reinigungsschritt beobachtete auch Moriya (36).

### 2. Reinheitsmerkmale:

Die Präparation lieferte in der Disc-Elektrophorese ähnlich wie bei Hojima (37) eine etwas verwischte Bande, wie sie für Glykoproteine charakteristisch ist.

Bei der isoelektrischen Fokussierung wurde Mikroheterogenität des Enzyms beobachtet: Es erschienen 3 Fraktionen mit isoelektrischen Punkten von 3.8, 3.9 und 4.05. Ursachen dieser Mikroheterogenität sind entweder enzymatische Prozesse, wobei der Glykosid- oder Proteinanteil des HUK durch in Niere und Urin vorhandene Enzyme verändert wird (multiple Formen), oder es liegen sog. Isoenzyme vor, die durch genbedingte Variation der Struktur des HUK bedingt sind. Für das Vorliegen echter Isoenzyme spricht das Auftreten von 2 - 3 Banden mit annähernd gleichen pI-Werten auch bei anderen

Autoren. So erhielt Hial (35) pI - Werte von 3.8, 3.95, 4.06, Moriya (36) von 3.9, 4.0, 4.2 und Hojima (37) von 3.7 und 4.3.

### 3. Molekulargewicht:

Das Molekulargewicht wurde durch Gelfiltration an Sephadex G - 100 zu 64 000 bestimmt. In der SDS - Elektrophorese ergaben sich nach Reduktion mit Mercaptoäthanol in Gegenwart von Harnstoff und SDS zwei Banden mit Molekulargewichten von 45 000 und 29 000, obwohl in der analytischen Disc-Elektrophorese (ohne Reduktion) nur eine Bande erschienen war.

Abweichend davon erhielt Porcelli (32) durch Elektrophorese nach Weber und Osborn (38) für HUK ein Molekulargewicht von 37 000. - Ähnliche Werte wie wir dagegen erhielten Hial (35) mit 43 600 und Moriya (36) für HUK I - III mit 27 000, 27 000 und 29 000 mittels Gelfiltration. In einer früheren Arbeit wird von diesem Autor auch ein Molekulargewicht von 40 500 angegeben.

Diese Unterschiede bei der Bestimmung des Molekulargewichts des HUK lassen sich noch nicht eindeutig erklären. Eine Aggregation von HUK - Molekülen zu höhermolekularen Einheiten, wie sie Moriya (36) diskutiert, als auch das Vorliegen von Isoenzymen, wären mögliche Erklärung dieser unterschiedlichen Befunde.

### 4. Kinetische Charakterisierung:

Zur kinetischen Charakterisierung des isolierten HUK wurde von fast allen Autoren BzArgOEt verwendet. Dabei wurden für die Michaelis-Menten-Konstante und die maximale Geschwindigkeit der BzArgOEt-Spaltung durch HUK sehr unterschiedliche Werte bestimmt. So fanden andere Autoren für die maximale Geschwindigkeit  $V_m$  ( Mol Substrat  $\times$  min<sup>-1</sup>  $\times$  Protein<sup>-1</sup>) folgende Werte: 0.34 (Hial, 35), 20 (Pierce, 31),

0.24 (Hojima, 37) und 0.03 - 2.8 (Moriwaki, 39). Ähnliche Unterschiede wurden auch bei den Michaelis-Menten-Konstanten beobachtet.

Das synthetische Substrat BzArgOEt besitzt nur eine geringe Affinität zu HUK und ist auch nicht streng spezifisch. Die Unterschiede lassen sich möglicherweise durch das Vorliegen von Isoenzymen erklären. Moriya (36) beschreibt unterschiedliche Affinitäten der Isoenzyme zu BzArgOEt. Wenn nun bei den verschiedenen Isolierverfahren der einzelnen Autoren verschiedene Isoenzymkonzentrationen vorlagen, so lassen sich die unterschiedlichen Michaelis-Menten-Konstanten und maximalen Geschwindigkeiten dadurch erklären, daß immer nur Summenwerte (von wechselnden Isoenzymgemischen) bestimmt wurden.

Hemmkinetik: In Übereinstimmung mit Untersuchungen von Moriya (36) und Hial (35) wird HUK durch Trasylol und Benzamidin-HCl kompetitiv gehemmt, nicht jedoch durch Sojabohnentrypsininhibitor. Die Bestimmung der Inhibitorkonstanten ergab für Trasylol eine Dissoziationskonstante  $K_i$  von  $0.6 - 3.1 \times 10^{-9}$  M und für Benzamidin-HCl  $K_i = 0.2 \times 10^{-3}$  M (CbzTyrONp als Substrat). In der Literatur findet sich nur eine  $K_i$ -Angabe für Benzamidin-HCl von  $6.42 \times 10^{-3}$  M bei Hial (35), bei der jedoch TosArgOMe als Substrat verwendet wurde.

Die Ergebnisse lassen erkennen, das HUK durch Trasylol wesentlich stärker gehemmt wird als durch Benzamidin-HCl.

##### 5. Nachweis des HUK:

Die CbzTyrONp-Spaltung erwies sich als der einfachst zu handhabende Nachweis bei relativ hoher Spezifität.

Nachteilig zeigte sich die bei pH 8.0 starke Spontanverseifung des Esters, die sich in hohen Leerwerten ausdrückte. Außerdem war Linearität der Kinetik nur über einen kurzen Zeitraum ( 1 - 3 min) gegeben. Dennoch erforderte diese Methode gegenüber der HMW-Kininogen-Spaltung und anschließende biologische Bestimmung der Kinine am Rattenuterus einen geringeren Aufwand. Der Quotient der spezifischen Aktivitäten der CbzTyrONp- und HMW-Kininogen-Spaltung blieb während der Isolierschritte konstant (vgl. S. 25). Dagegen veränderte sich der Quotient der spezifischen Aktivität der BzArgOEt- und HMW-Kininogen-Spaltung. Dies legt die Vermutung nahe, daß während der Präparation Proteasen abgetrennt wurden, die zwar BzArgOEt spalten, aber kein HMW-Kininogen.

CbzTyrONp besitzt demzufolge die bessere Substratspezifität als BzArgOEt, was mit ein Grund war, es als synthetisches Substrat für HUK zu verwenden.

VII. Literaturübersicht

1. Margolius, H. S., Geller, R., De Jong, W.  
Pisano, J. J. und Sjoerdsma, A. (1972)  
Circul. Res. Vol. XXX, 358 - 362
2. Abelous, J. E. und Bardier, E. (1909)  
C. R. Soc. Biol. (Paris) 66, 511 - 512
3. Werle, E. (1973)  
in "Kininogenases", (Ed.: Haberland, G. L.,  
Rohen, J. W.) Schattauer Verlag, Stuttgart, 7 - 22
4. Werle, E. (1970)  
in "Handbook of Exp. Pharm." (Ed.: Erdös, E. G.)  
Vol. XXV, Springer Berlin, 1 - 6
5. Mills, J. H. und Ward, P. E. (1975)  
J. Physiol. 246, 695 - 707
6. Nustad, K. und Vaaje, K. (1975)  
Br. J. Pharm. 53, 229 - 234
7. Elliot, D. F. (1970)  
in "Handbook of Exp. Pharm." (Ed.: Erdös, E. G.)  
Vol. XXV, Springer Berlin, 7 - 13
8. Ganong, W. F. (1971)  
"Medizin. Physiologie", Springer Verlag  
Berlin, 51 - 52, 1. Auflage
9. Werle, E. und Korsten H. (1938)  
Zeitschr. f. d. Ges. Exp. Med. 103 (1) 152 - 162
10. Geller, R. G., Margolius, H. S., Pisano, J. J.  
und Keiser, H. R. (1972)  
Circ. Res. XXXI, 857 - 861

11. Marin-Grez, M., Cottone, P. und Carretero, O. A.  
(1972)  
Am. J. Physiol. 223 (4) 794 - 796
12. Mc Giff, J. C., Crowshaw, K. und Itskovitz, H. D.  
(1974)  
Fed. Proc. 33, 39 - 47
13. Mc Giff, J. C., Terragno, N. A., Malik, K. V.  
und Lonigro, A. J. (1972)  
Circ. Res. 31, 36 - 43
14. Stoner, J., Manganiello, V. C. und Vaughan, M.  
(1973)  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70 (12 II) 3830 - 3833
15. Fritz, H., Brey, B., Schal, A. und Werle, E.  
(1969)  
Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 350, 617
16. Mann, K., Geiger, R. und Werle, E. (1975)  
in "Advances in Exp. Medicine and Biology"  
(Ed.: Back, N. and Sicuteri, S.)  
Plenum Press, New York, in Druck
17. Werle, E. und Kaufmann-Bötsch, B. (1959)  
Naturwissenschaften 236, 492
18. Trautschold, J., Werle, E. und Schweitzer, G.  
(1974) in "Methoden der Enzym. Analyse"  
(Ed. Bergmeyer, H. U.), 3. Auflage, 1071 - 1080  
Verlag Chemie, Weinheim
19. Moriwaki, C., Inoue, N., Hojima, Y. und  
Moriya, H. (1971)  
Yakugaku Zasshi 91 (3) 413 - 416

20. Martin, C. I., Golubow, J. und Axlrod, A. E.  
(1959)  
J. Biol. Chem. 234 (2) 294 - 298
21. Geiger, R. und Mann, K. (1976)  
Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chemie 357, 533 - 558
22. Geiger, R., persönliche Mitteilung
23. Affinity Chromatography - Principles and  
Methods (1974)  
Pharmacia Fine Chemicals AB, S 75 104 Uppsala  
Schweden
24. Richterich, R. (1968)  
"Klinische Chemie", 2. Auflage,  
Akademische Verl. Ges., Frankfurt/Main, 303 - 304
25. Maurer, H. R. (1971)  
"Disc-Elektrophoresis", 2. Auflage  
Walter de Gruyter Verlag
26. Dunkert, A. K. und Rueckert, R. R. (1969)  
J. Biol. Chem. 244, 5074 - 5080
27. Karlsson, C. und Öhmann, J. (1973)  
LKB Application Note 58, 1 - 3
28. Habermann, E. (1970)  
in "Handbook of Exp. Pharm." (Ed.: Erdös, E. G.)  
Vol. XXV, Springer Verlag Berlin, 250 - 288
29. Ahlers, A., Arnold A., von Döhren, R. und  
Peter, H. W. (1974)  
"Enzymkinetik", Gustav Fischer Verlag, Stuttgart
30. Green, N. M. und Work, E. (1953)  
Biochem. J. 54, 347

- 31 Pierce, J. V. (1970)  
in "Handbook of Exp. Pharm." (Ed.: Erdős, E. G.)  
Vol. XXV, Springer Verlag, Berlin, 33 - 37
- 32 Porcelli, G., Marrini-Bettolo, G. B., Croxatto, H. R.  
und Di Iorio, M. (1974)  
Italian J. Biochem. 23, 44 - 55
- 33 Porcelli, G., Croxatto, H. und Porcelli, F. (1972)  
Advances in Exp. Med. Biol. (Ed.: Back, N. und  
Sicuteri, F.), Vol. 21, 135 - 139
- 34 Diniz, C. R., Pereira, A., Barroso, J. und  
Mares-Guia, M. (1965)  
Biochem. Biophys. Res. Comm. 21 (5) 448 - 453
- 35 Hial, V., Diniz, C. R. und Mares-Guia, M. (1974)  
Biochemistry 13 (21) 4311 - 4318
- 36 Moriya, H., Matsuda, Y., Fujimoto, Y., Hojima, Y.  
und Moriwaki, C. (1973)  
in "Kininogenases" (Ed.: Haberland, G. L. und Rohen, J. W.)  
Schattauer Verlag, Stuttgart, 37 - 42
- 37 Hojima, Y., Matsuda, Y., Moriwaki, C. und  
Moriya, H. (1975)  
Chem. Pharm. Bull. 23 (5) 1120 - 1127
- 38 Weber, K. und Osborn, M. (1969)  
J. Biol. Chem. 244, 4406
- 39 Moriwaki, C., Hojima, Y. und Moriya, H. (1974)  
Chem. Pharm. Bull. 22 (5) 975 - 983

An dieser Stelle möchte ich

Herrn Professor Dr. rer. nat. Hans F r i t z

für die Überlassung des Themas und seine großzügige Förderung danken.

Herrn Dr. med. Klaus M a n n

danke ich für sein freundliches Entgegenkommen.

Herr Dr. rer. nat. Reinhard G e i g e r

hat mich bei meiner Arbeit immer bereitwillig unterstützt.

Ihm danke ich sehr herzlich für die gegebenen Anregungen und für die vielen wertvollen Diskussionen.

Last not least ein Dankeschön Fräulein Karin Schuster und Fräulein Ilse Meier für die gewissenhafte Durchführung der biologischen Tests.



## Lebenslauf

Am 27. Februar 1949 wurde ich als Sohn des Bauingenieurs Hans Josef Bettels und seiner Ehefrau Ingeborg, geb. Andrich, in Immenstadt/Allgäu geboren.

Nach 4 Jahren Volksschule in Bühl am Alpsee besuchte ich 3 Jahre die Oberrealschule Maria Stern in Immenstadt. Anschließend wechselte ich zum Gymnasium Oberstdorf über und legte dort im Juni 1968 mein Abitur ab.

Mit dem Wintersemester 1968/69 begann ich das Studium der Chemie an der Technischen Hochschule München und legte im März 1970 den 1. Teil der Diplomvorprüfung ab.

Ab Sommersemester 1970 studierte ich Medizin an der Universität München. Das Vorphysikum bestand ich im September 1970 und das Physikum im Wintersemester 1971/72. Am 29. Juli 1975 legte ich mein Staatsexamen in Medizin ab.

Seit dem 1. April 1976 arbeite ich als Medizinalassistent.









